



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 41 22 210 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁵:
A 61 K 37/02
C 07 K 15/06
C 07 K 15/16

(2)

②1 Aktenzeichen: P 41 22 210.5
②2 Anmeldetag: 4. 7. 91
④3 Offenlegungstag: 14. 1. 93

DE 41 22 210 A 1

⑦1 Anmelder:

Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 6900 Heidelberg, DE

⑦4 Vertreter:

Deufel, P., Dipl.-Wirtsch.-Ing.Dr.rer.nat.; Hertel, W.,
Dipl.-Phys.; Lewald, D., Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000
München

⑦2 Erfinder:

Sinn, Hans-J., Dr., 6908 Wiesloch, DE; Schrenk,
Hans-Hermann, 6721 Zeiskam, DE; Friedrich,
Eckhard, Prof. Dr., 6741 Ilbesheim, DE; Grasczew,
Georgi, Dr., 6909 Gauangelloch, DE; Elias, Horst,
Prof. Dr., 6100 Darmstadt, DE; Maier-Borst,
Wolfgang, Dr., 6901 Dossenheim, DE

⑤4 Konjugate aus tumoraktiver Verbindung und Protein sowie Verfahren zu deren Herstellung und ihre
Verwendung

⑤7 Die Erfindung betrifft Konjugate aus einer tumoraktiven
Verbindung, die mindestens eine Carboxylgruppe aufweist,
und einem Protein, das vom Organismus nicht als fremd
angesehen wird, wobei das Protein in nativer Form vorliegt.
Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung
solcher Konjugate sowie die Verwendung dieser.

DE 41 22 210 A 1

DE 41 22 210 A1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate aus einer tumoraktiven Verbindung, die mindestens eine Carboxylgruppe aufweist, und einem Protein, das vom Organismus nicht als körperfremd angesehen wird. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung solcher Konjugate und die Verwendung dieser.

Seit längerem ist bekannt, tumoraktive Verbindungen an Proteine zu binden, um dadurch das Verbleiben der Verbindungen im Kreislauf des Patienten zu verlängern. Konjugate obiger Art, insbesondere aus Methotrexat und Serumalbumin, sind hierfür als Beispiel zu nennen (vgl. Chu, B.C.F. and Whiteley, J.M. Mol. Pharmacol. (1977), 13, 80-88). Zu ihrer Herstellung werden die tumoraktiven Verbindungen direkt mit den Proteinen in Gegenwart von Carbodiimid umgesetzt. Hierbei entsteht sowohl inter- als auch intramolekulares Cross Linking, wodurch die Proteine in den Konjugaten letztlich in modifizierter Form vorliegen.

Es hat sich nun gezeigt, daß solche Konjugate im Organismus wenig stabil sind. Vielfach werden ihre Proteine sofort in der Leber abgebaut. Damit werden die tumoraktiven Verbindungen frühzeitig freigesetzt und an einem längeren Verbleiben im Kreislauf des Patienten gehindert. Auch stellt die Freisetzung der tumoraktiven Verbindungen in der Leber für diese eine große Belastung dar.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Konjugate obiger Art dahingehend zu verbessern, daß die angesprochenen Nachteile vermieden werden können.

Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß die Proteine in den Konjugaten in nativer Form vorliegen.

Als Proteine eignen sich hierfür insbesondere Serumalbumin, Fibrinogen, Transferrin, Immunglobuline und Lipoproteine. Für die Wahl der Proteine ist es dabei nicht entscheidend, welche tumoraktiven Verbindungen gebunden werden sollen. Dies können beispielsweise aromatische Verbindungen, insbesondere Methotrexat und Derivate davon, Anthrachinon-2-Carbonsäure und Derivate davon, Carminsäure und Derivate davon sowie ein Platinkomplex, sein.

Auch können mehrere verschiedene tumoraktive Verbindungen an ein Protein gebunden werden. Hierbei hat sich die Bindung zweier aromatischer Verbindungen, insbesondere von Methotrexat und einem Platinkomplex, als günstig erwiesen.

Erfindungsgemäße Konjugate können hergestellt werden, indem tumoraktive Verbindungen mit Carbodiimid und Hydroxysuccinimid zu reaktiven Succinimidyestern und diese mit Proteinen umgesetzt werden. Bei Konjugaten mit mehreren verschiedenen tumoraktiven Verbindungen kann die Herstellung der einzelnen Succinimidyester gemeinsam oder getrennt erfolgen.

Die Umsetzung der tumoraktiven Verbindung mit Carbodiimid und Hydroxysuccinimid erfolgt in einem polaren aprotischen Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid (DMF). Das Mol-Verhältnis von tumoraktiver Verbindung: Carbodiimid: Hydroxysuccinimid beträgt etwa 1 : 1,5 : 6,0. Der gebildete Succinimidyester wird dann in einer wäßrigen Pufferlösung, vorzugsweise NaHCO_3 , mit dem Protein umgesetzt. Die Proteinkonzentration beträgt etwa 10-20 mg/ml. Die hierbei gebildeten Konjugate werden mehrfach gereinigt, beispielsweise durch Ultrafiltration, und schließlich steril filtriert, worauf sie applikationsfertig sind.

Erfindungsgemäße Konjugate zeichnen sich dadurch

aus, daß sie über lange Zeit im Kreislauf des Patienten verbleiben. Ihre Proteine weisen eine ähnliche Stabilität auf, wie in nicht-gebundener Form. Somit lassen sich tumoraktive Verbindungen in sehr hoher Dosis, nämlich bis zu 6% der applizierten Dosis, in Tumoren anreichern.

Erfindungsgemäße Konjugate eignen sich somit insbesondere zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

Die vorliegende Erfindung wird durch das Beispiel verdeutlicht.

Beispiel

Herstellung eines Konjugates aus

Anthrachinon-2-Carbonsäure und Serumalbumin

Zu 40 mg (etwa 0,16 mMol) Anthrachinon-2-Carbonsäure (Ac-2-c) und 115 mg (1 mMol) Hydroxysuccinimid (HSI), gelöst in 4 ml Dimethylformamid (DMF), werden 50 mg (etwa 0,24 mMol) Di-Cyclohexyl-carbodiimid (DCC) gegeben. Das Mol-Verhältnis beträgt etwa 1 : 1,5 : 6,0. Die Umsetzung wird bei Raumtemperatur durchgeführt und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) kontrolliert:

DC-Platten:	Silikagel 60 mit F_{254}
Laufstrecke:	10 cm, Laufzeit 20 min
Laufmittel (v/v):	Ethylacetat/Methanol (75/25)
Rf-Werte:	ursp. 0,1 Succinimidyester 0,8

Nachdem mehr als 80% der Ausgangsverbindung umgesetzt sind (etwa nach 24 h), bringt man den in DMF gelösten Succinimidyester bei Raumtemperatur in eine NaHCO_3 (0,13 Mol) gepufferte Serumalbuminlösung (pH 8,5) ein, die eine Proteinkonzentration von etwa 10-20 mg/ml aufweist.

Nach einer Reaktionszeit von 20-30 min wird möglicher Überschuß an DCC über ein Membranfilter (0,45 µm) abgetrennt, die Reaktionsmischung mit 400 ml Ampuwa verdünnt und einer Reinigung durch Ultrafiltration unterworfen. Es werden dabei DMF, Wasser, HSI und Salze abgetrennt. Nach einem zweiten Waschvorgang und anschließender Sterilfiltration ist das Konjugat applikationsfertig.

Patentansprüche

1. Konjugat aus einer tumoraktiven Verbindung, die mindestens eine Carboxylgruppe aufweist, und einem Protein, das vom Organismus nicht als körperfremd angesehen wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein in nativer Form vorliegt.
2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als tumoraktive Verbindung eine aromatische Verbindung vorliegt.
3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als aromatische Verbindung Methotrexat oder ein Derivat davon vorliegt.
4. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als aromatische Verbindung Anthrachinon-2-Carbonsäure oder ein Derivat davon vorliegt.
5. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als aromatische Verbindung Carminsäure oder ein Derivat davon vorliegt.
6. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,

DE 41 22 210 A1

3

4

zeichnet, daß als aromatische Verbindung ein Platinkomplex vorliegt.

7. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere verschiedene tumoraktive Verbindungen vorliegen.

8. Konjugat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als tumoraktive Verbindungen zwei verschiedene aromatische Verbindungen vorliegen.

9. Konjugat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als aromatische Verbindungen Methotrexat und ein Platinkomplex vorliegen.

10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Protein Serumalbumin vorliegt.

11. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Protein Fibrinogen vorliegt.

12. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Protein Transferrin vorliegt.

13. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Protein ein Immunglobulin vorliegt.

14. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Protein ein Lipoprotein vorliegt.

15. Verfahren zur Herstellung der Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die tumoraktive Substanz mit Carbodiimid und Hydroxysuccinimid zu einem reaktiven Succinimidylester und dieser mit dem Protein umgesetzt wird.

16. Verfahren zur Herstellung der Konjugate nach einem der Ansprüche 7 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die tumoraktiven Substanzen gemeinsam oder getrennt mit Carbodiimid und Hydroxysuccinimid zu reaktiven Succinimidylestern und diese mit dem Protein umgesetzt werden.

17. Verwendung der Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

45

50

55

60

65

BEST AVAILABLE COPY

- Leerseite -

esp@cenet document view

<http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&I...>

Conjugate comprising antitumoural cpd. and protein in native form - which is stable and accumulates at high levels in the tumour

Publication number: DE4122210

Publication date: 1993-01-14

Inventor: SINN HANS-J DR (DE); SCHRENK HANS-HERMANN (DE); FRIEDRICH ECKHARD PROF DR (DE); GRASCHKEW GEORGI DR (DE); ELIAS HORST PROF DR (DE); MAIER-BORST WOLFGANG DR (DE)

Applicant: DEUTSCHES KREBSFORSCH (DE)

Classification:

- International: A61K47/48; C07K14/765; A61K47/48; C07K14/435; (IPC1-7): A61K37/02; C07K15/06; C07K15/16

- european: A61K47/48R2L; C07K14/765

Application number: DE19914122210 19910704

Priority number(s): DE19914122210 19910704

[Report a data error here](#)

Abstract of DE4122210

Conjugates (A) comprising an antitumour cpd. (I) contg. at least one carboxyl gp. and a protein (II) in native form are new. (I) is pref. an aromatic cpd., esp. methotrexate, an anthraquinone-2-carboxylic acid, a carminic acid or a platinum complex or a mixt. of such cpds.. (II) is pref. serum albumin, fibrinogen, transferrin, an immunoglobulin or a lipoprotein. In the prepn., (I) is converted with carbodiimide and hydroxysuccinimide into a succinimidyl ester which is reacted with (II). Reaction of the ester with (II) is carried out in aq. buffer using (II) in a concn. of 10-20 mg/ml. USE/ADVANTAGE - (A) are useful for the treatment of tumours. They are more stable than known conjugates, e.g., of methotrexate and serum albumin described in Mol. Pharmacol. (1977) 13, 80-88, and provide high accumulation of (I) in tumours, e.g., up to 6% of the dose administered.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide